

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-196908

(43)公開日 平成9年(1997)7月31日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/48			G 0 1 N 33/48	B
				H
1/28			1/28	J

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 12 頁)

(21)出願番号 特願平8-7691

(22)出願日 平成8年(1996)1月19日

(71)出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社
神奈川県南足柄市中沼210番地

(72)発明者 北島 昌夫
埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写
真フイルム株式会社内

(72)発明者 矢沢 建一郎
埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写
真フイルム株式会社内

(74)代理人 弁理士 田中 政浩

(54)【発明の名称】 血漿または血清試料の調製方法

(57)【要約】

【課題】 高ヘマトクリット血液であっても溶血を起こさせることなく高い分離率で血漿を容易に取得しうる手段を提供する。

【解決手段】 全血に無機塩またはアミノ酸もしくはその塩の水溶液を全血の体積の20%以下、かつ、該無機塩またはアミノ酸もしくはその塩の濃度が全血1mlあたり10~200 μ molの濃度となるように混合し、次いで血球成分を濾別することを特徴とする、全血から血漿または血清試料の調製方法を濾別する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 全血に無機塩またはアミノ酸もしくはその塩の水溶液を全血の体積の20%以下、かつ、該無機塩またはアミノ酸もしくはその塩の濃度が全血1mlあたり10~200 μ molの濃度となるように混合し、次いで血球成分を濾別することを特徴とする、全血から血漿または血清試料の調製方法。

【請求項2】 請求項1において、該無機塩またはアミノ酸もしくはその塩の水溶液の濃度が0.1~5molであることの特徴とする、全血から血漿または血清試料を調製する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は全血から血漿または血清試料を調製する方法に関し、特にヘマトクリット値の高い全血から血球を破壊させることなく血漿や血清試料を高い分離率で取得しうる方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】血液中の構成成分例えば代謝産物、蛋白質、脂質、電解質、酵素、抗原、抗体などの種類や濃度の測定は通常全血を遠心分離して得られる血漿または血清を検体として行われている。ところが、遠心分離は手間と時間がかかる。特に少数の検体を急いで処理したいときや、現場検査などには、電気を動力とし、遠心分離機を必要とする遠心法は不向きである。そこで、濾過により全血から血漿を分離する方法が検討されてきた。

【0003】この濾過方法には、ガラス繊維濾紙をカラムに充填し、カラムの一方から全血を注入し、他方から血漿や血清を得るいくつかの方法が公知化されている

(特公昭44-14673号公報、特開平2-208565号公報、特開平4-208856号公報、特公平5-52463号公報等)。

【0004】しかし、全血から濾過により自動分析等による測定に必要な量の血漿または血清を得る方法に関しては血糖など一部の項目を除いては、いまだ試行の段階にあり、広く実用化されるに至っていない。

【0005】その理由は、これまでの濾過方式では、主に下記3つの条件を満たしていないためであろうと考えられる。

【0006】1) 自動分析に必要な十分な量の血漿を濾過によって得ることが難しい。

2) 濾過により赤血球の破壊(溶血)が起こり易く、溶血により血漿(血清)中に放出されるヘモグロビン(Hb)の干渉を受け易い測定項目や、血球内の存在量が血漿(血清)中よりも多い、GOT、GPT、LDH、Na、Kなどの測定が難しい。

3) 濾過方式による場合、全血中で赤血球が占める割合いわゆるヘマトクリット値が高い検体(50%以上)では、赤血球による濾過材料の目詰まりが起こってしまい、うまく濾過できない。

【0007】例えば、特公平6-64054号公報では、特定の材料を用いて作ったガラス繊維濾紙による血漿濾過技術を開示しているが、取り出し得る血漿の量は用いるガラス繊維濾紙の体積の1/2以下に限定せざるを得ないとしている。この特許では、Hctの上限は50%であるとの前提の下に、ガラス繊維濾紙の空間を赤血球が充填し切った状態を想定し、この状態になるまでに濾過し得る血漿の量が最大ガラス繊維濾紙の体積の50%であるとしているのである。しかし、日常臨床検査室で扱う全血検体としてHct55~60%のものが含まれていることも珍しくない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、全血から血漿を分離する際の大きな障害となる高ヘマトクリット検体、具体的には新生児や、脱水状態にある患者からの全血で記録されることのある、ヘマトクリット値が60~70%の範囲の全血でも、濾過により確実に血漿分離ができる手段を提供することにある。

【0009】本発明の他の目的は、ガラス繊維を用いる血漿濾過において、分離回収される血漿量が、ガラス繊維濾紙の体積の1/2に限定されることなく、通常の臨床検査用自動分析装置による多項目測定に必要な100 μ l以上の血漿(血清)をどんなヘマトクリット値からでも確実に分離回収する手段を提供することにある。

【0010】本発明のさらに他の目的は、従来カラム方式の濾過によっては実現が難しかった、臨床化学検査や免疫血清学検査の大部分の検査項目の測定に適合した、血球成分の破壊を伴わない、良質の血漿を得る手段を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】全血からの血漿分離技術の開発における問題点は、以下の3点に要約される。

(1) 血漿分離の過程で赤血球の破壊(溶血)を起こさせないこと。赤血球の破壊により、血球内成分、特にHb、GOT、LDH、Kなど血漿中よりも血球内の存在量が血漿中よりも著しく多い成分の血漿中への放出が起こって誤差の原因となり、また、Hbの血漿中への放出により光学的に測定の妨害となる。

(2) ヘマトクリット値が高く(50%以上)、赤血球の分離が難しく、且つ、より溶血を起こし易い検体についても確実に血漿分離ができること。ヘマトクリットが高くなると「血液の粘性が」急激に増加する結果濾過による分離が著しく難しくなる。

(3) 血漿分離の過程で組成の変化が起こらないこと。

【0012】本発明者は、上記課題を解決して、高ヘマトクリット値の全血検体であっても溶血を起こさせることなく高い分離率で血漿を分離取得しうる手段を開発するべく鋭意検討の結果、全血検体にヘマトクリット値を低下させることのできる薬剤を特定濃度範囲内になるよ

うに添加してから血漿を分離することによりこの目的を達成することができた。

【0013】すなわち、本発明は、全血に無機塩またはアミノ酸もしくはその塩の水溶液を全血の体積の2.0%以下、かつ、該無機塩またはアミノ酸もしくはその塩の濃度が全血1mlあたり10~200μmolの濃度となるように混合し、次いで血球成分を濾別することの特徴とする、全血から血漿または血清試料の調製方法に関するものである。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明の方法が適用される全血検体は、ヘパリン、NaF、EDTA、モノヨード酢酸などの抗凝固剤や解糖阻止剤などの有無を問わない。本発明の方法が威力を発揮するのは高ヘマトクリット血液であり、ヘマトクリット値が50~70%、特に55~70%のものである。

【0015】無機塩やアミノ酸やその塩は全血における血球と血漿の分離を促進してヘマトクリットを低下させる作用を有するもの（以下、「HL剤」と称することがある。）である。

【0016】無機塩、アミノ酸およびその塩であるHL剤はいずれも水溶性であって溶解度が20℃で100mM以上、好ましくは1M以上、さらに好ましくは3M以上のものが適当である。無機塩の例としては1価または2価のアルカリ金属またはアルカリ土類金属とハロゲン元素、NO₃、SO₄またはCO₃との組合せからなるものを挙げることができる。代表例には、NaCl、CsCl₂、Li₂SO₄、CaCl₂、Rb₂SO₄、Cs₂SO₄などがある。アミノ酸の例としては天然アミノ酸を挙げることができる。代表例にはGly、Ala、Asp、Glu、グリシンアミドアスパラギンなどがある。無機塩やアミノ酸は水溶液のpHが5~8、好ましくは6~7.5になるようにし、そのため、無機塩やアミノ酸塩はNaHCO₃のように水素塩であってもよい。また、アミノ酸もAspやGluのような酸性アミノ酸はアルカリ金属やアルカリ土類金属等の塩とし、LysやArgのような塩基性アミノ酸の場合にはハロゲン元素、NO₃、SO₄、CO₃等の塩とすることができる。

【0017】HL剤の選択に当たっては、測定目的に対する適合性、すなわち血漿中のどのような成分を測定するかにより、化合物を検討する必要がある。例えば、血中のナトリウムやクロルを測定しようとする場合にNaClを使用すれば、測定値は大幅にずれてしまうし、無機燐を測定しようとする場合に燐酸塩は使えない。また、測定に使用する試薬の反応性に影響を与える化合物は使えない。例えば、カルシウムの測定の干渉物質となるマグネシウムや鉄、銅、バリウム、亜鉛を含む化合物は、カルシウムを測定しようとする場合には使えない。

【0018】上記のHL剤は水溶液として使用される。

HL剤の濃度は0.1~5M程度、好ましくは0.5~3M程度、さらに好ましくは1~2.5M程度が適当である。

【0019】HL剤水溶液にはHL剤以外の成分も加えておくことができる。例えば、HL剤の乾燥防止を目的としてグリセリン、エチレングリコール、ポリエチレングリコール等を加えても良い。また、pHを調節する目的で緩衝剤を加えても良い。さらに、分析の目的に応じ、濾過血漿中での被検物質の分離を容易にするために各種の化合物を加えることができる。HDLコレステロール測定に分画試薬であるデキストランやリントングステン酸等、LDLコレステロールとの選択的な結合試薬がその例である。このような成分の他の例として、各種抗原や抗体（修飾を加えたものを含む）など血漿中の特定成分と反応性を有する化合物がある。

【0020】HL剤を全血に加えると赤血球膜の柔軟性が失われて変形しにくくなる。通常、全血を濾過しようすると赤血球の見かけの大きさより十分に小さな空隙、例えば直径1~2μmのキャピラリーであっても通り抜けてしまうことが知られているが、HL剤を添加することにより赤血球の強度の変形はなくなるので、濾過が非常にし易くなる。

【0021】HL剤によるヘマトクリット低下効果は、HL剤を添加する全血中の血漿体積に対するHL剤のモル濃度に比例する。一方、HL剤の濃度が200mmol/l以上になると血球の破壊（溶血）が起こり易くなり赤血球の主成分であるヘモグロビンが血漿中に溶出してくる。そこで、HL剤の全血への添加量はHL剤の濃度が全血1mlあたり10~200μmol程度、好ましくは10~100μmol程度、更に好ましくは20~60μmol程度となるようにする。HL剤水溶液の添加量としては厳密な制限はないが、HL剤の添加量をあまり大きくすると全血の希釈率が大きくなりすぎて、秤量誤差を大きくするので好ましくない。また、希釈倍率が高くなると測定感度との関係で、測定時の精度や正確度が問題となる。そこで、HL剤水溶液の添加量は容積比で全血の20%以下、好ましくは10%以下、さらに好ましくは5%以下とする。添加量の下限はHL剤水溶液におけるHL剤の溶解度等に応じて決まり、通常1%以上である。このように、HL剤を少量添加するだけで濾過がしやすくなるので、測定法の感度や正確度への影響が少ない。そこで、HL剤水溶液の添加量は容積比で全血の20%以下、好ましくは10%以下、さらに好ましくは5%以下とする。添加量の下限はHL剤水溶液におけるHL剤の溶解度等に応じて定まり、通常1%以上である。

【0022】HL剤を加えると、HL剤は血漿に溶解して血漿の浸透圧を高める。HL剤の添加により血球内と血漿中での浸透圧の間にギャップが生ずる。この血球内外の浸透圧差を緩和させるような力が働く。すなわち、

血球内の水を血漿中に排出し、血球内の浸透圧（すなわち溶質濃度）を高くし、血漿の浸透圧を下げて血球内外の圧力差をなくすような力が働く。その結果、血球の体積は減少し、血漿の体積が増加する。その結果として、ヘマトクリットが低下する。

【0023】HL剤の添加により赤血球の体積が減少し、血球膜の柔軟性も減少するので、多孔質膜などによる濾過材の濾過が非常にし易くなる。またフリーの血漿量が増えるので、濾過による血漿の回収率が向上する。

【0024】HL剤によるヘマトクリットの低下は、HL剤の濃度と共に上昇するが、血球膜は強度が弱いので、ある程度以上濃くなると血球は破壊、溶血し易くなる。HL剤の作用は主としてその浸透圧に由来するので、全血中（正確には血漿中）の溶質分子数に比例する。HL剤の添加量が多すぎると血球内外の浸透圧差が大きくなりすぎて、血球が破裂したり、血球膜の一部に穴があいて、血球内成分が血漿中に漏出する。

【0025】一般に血液検査は血漿中の成分濃度の測定を基本としている。赤血球が破壊したり血球膜の一部に穴があくと、赤血球内成分が血漿中に漏出してしまふ。赤血球内には高濃度のHb（ヘモグロビン）が詰まっているので、このような漏出が起こると血漿が赤くなる（溶血という）。赤血球の破壊は僅かであってもHbの漏出による血漿の着色は無視できず、項目によって測定値に強く影響する。例えば、健康者の血液検査において、全血球の0.1%が破壊したとすると、CPK、ALPなど多くの酵素の測定値は正しく測れない。赤血球内には血漿中よりも濃度の高い成分（GOT、GPT、LDH、K）があるのでこれらの項目の測定についても溶血の影響を直接受ける。そこで、血漿の分離、回収に当たっては、溶血ができるだけ少ない条件で実施する必要がある。

【0026】健康者の全血中にはおよそ15g/dlのヘモグロビン（Hb）が含まれている。Hbが血漿（血清）中に漏洩（溶血）すると測定値に影響を与える。その程度は測定法、測定項目によって異なる。

【0027】例えば、血糖やコレステロールの測定については溶血の影響を受けにくく、150mg/dl程度のHbが血漿中に含まれていても（全体の1%が溶血したことに相当）正しく測定される。

【0028】一方、GOT、GPT、LDH、K等は溶血の影響を受け易く、特にLDHやKではHbが15mg/dl（全体の0.1%の溶血に相当）であっても、測定値は臨床診断上有意な影響を受ける。

【0029】従って、血糖やコレステロールの測定のみを目的とする場合は、血漿分離法として不十分であっても良いが、GOT、GPT、LDH、K等を含めて正しく測ることを目的とする場合には、0.1%以上の溶血があってはならない。

【0030】健康者のHctは40～45%であるが、

日常の臨床検査では数%の頻度でHctが55～60%を示す検体も扱う必要がある。この場合Hbは20～25g/dlとなるので、測定法のHbに対する許容範囲を15mg/dlとすると、これらの高Hct検体では0.07%以下の溶血に抑える必要がある。

【0031】従来公知の無機塩やアミノ酸およびその塩またはレンチンなどの血球凝集素を乾燥状態で直接血液に溶解させたり、濾紙や多孔質材料に含浸、乾燥させておく方法においては、血液と乾燥固体が接触し、乾燥固体が血漿に溶解する初期の過程で局所的、一時的に溶血を起こし易い。従って、これらの方法で得た血漿は僅かながらHbの混入を伴っていることが多く、血糖やコレステロールの測定には問題がなくても、上記のGOT、GPT、LDH、Kなどの測定には耐えないものであった。この傾向はHctの高い検体ではさらに顕著であった。

【0032】これに対して、上記化合物を適当な濃度の水溶液にしてから血液と接触させると局所的な濃度の上昇の程度も少なく、また血漿中の拡散も速やかに進行することから溶血は非常に起こりにくくなる。

【0033】全血の使用量は0.3～3ml程度、通常0.5～1.5ml程度でよい。全血とHL剤水溶液の混合は単に数回振盪するだけでよい。HL剤の作用は殆ど瞬間的であって数秒のうちに平衡に達すると推定される。従って、混合に際しては温度や時間を特に調節する必要はない。

【0034】濾過材料は血球を分離しうる公知の濾過材料を用いることができる。このような濾過材料の例として、ガラス繊維濾紙、表面が親水化された弗素含有ポリマー、ポリスルホン等の血球分離能を有する微多孔性膜、ガラス繊維濾紙と微多孔性膜の積層体、ガラス繊維濾紙とセルロース濾紙の積層体、ガラス繊維濾紙とセルロース濾紙と微多孔性膜の積層体、特開昭62-138756～8号公報、特開平2-105043号公報、特開平3-16651号公報等に記載された繊維質多孔性膜と非繊維質多孔性膜の積層体等がある。好ましいものはガラス繊維濾紙を用いたものであり、ガラス繊維濾紙と微多孔性膜の積層体、ガラス繊維濾紙とセルロース濾紙の積層体、ガラス繊維濾紙とセルロース濾紙と微多孔性膜の積層体、が特に好ましい。また、ポリスルホン微多孔性膜を用いたものも好ましい。最も好ましいものはガラス繊維濾紙とセルロース濾紙と微多孔性膜の積層体であり、この微多孔性膜にポリスルホン膜を用いたものがとりわけ好ましい。

【0035】ガラス繊維濾紙は密度が0.02～0.2程度、好ましくは0.02～0.15程度、更に好ましくは0.02～0.09程度で、保留粒子径が0.8～9μm程度、特に1～5μm程度のものが好ましい。ガラス繊維の表面を特開平2-208565、同4-208566号公報等に記載された様に、親水性高分子で処理

することによって濾過をより速やかに円滑に行うことができる。また、ガラス繊維の表面をレクチンで処理することもできる。ガラス繊維濾紙は複数枚を積層して用いることができる。

【0036】表面を親水化されており血球分離能を有する微多孔性膜は、実質的に分析値に影響を与える程には溶血することなく、全血から血球と血漿を特異的に分離するものである。この微多孔性膜は孔径がガラス繊維濾紙の保留粒子径より小さくかつ $0.5\mu\text{m}$ 以上、好ましくは $0.5\sim 8\mu\text{m}$ 程度、より好ましくは $0.5\sim 4.5\mu\text{m}$ 程度、特に好ましくは $0.5\sim 3\mu\text{m}$ 程度のものが適当である。また、空隙率は高いものが好ましく、具体的には、空隙率が約40%から約95%、好ましくは約50%から約95%、さらに好ましくは約70%から約95%の範囲のものが適当である。微多孔性膜の例としてはポリスルホン膜、弗素含有ポリマー膜等がある。

【0037】弗素含有ポリマーの微多孔性膜としては、特表昭63-501594 (WO87/02267) に記載のポリテトラフルオロエチレンのフィブリル (微細繊維) からなる微多孔性のマトリックス膜 (微多孔性層)、Gore-Tex (W. L. Gore and Associates 社製)、Zitex (Norton 社製)、ポアフロン (住友電工社製) などがある。その他に、US 3268872 (実施例3及び4)、US 3260413 (実施例3及び4)、特開昭53-92195 (US 4201548) 等に記載のポリテトラフルオロエチレンの微多孔性膜、US 3649505 に記載のポリビニリデンフルオリドの微多孔性膜などがある。

【0038】これらの弗素含有ポリマーの微多孔性膜の作成に当たっては、1種もしくは2種以上の弗素含有ポリマーを混合しても良いし、弗素を含まない1種もしくは2種以上のポリマーや繊維と混合し、製膜したものであつても良い。

【0039】構造としては、延伸しないもの、1軸延伸したもの、2軸延伸したもの、1層構成の非ラミネートタイプ、2層構成のラミネートタイプ、例えば繊維等の他の膜構造物にラミネートした膜等がある。

【0040】フィブリル構造又は一軸延伸もしくは二軸延伸した非ラミネートタイプの微多孔性膜は、延伸により、空隙率が大きくかつ濾過長の短い微多孔膜が作られる。濾過長が短い微多孔膜では、血液中有形成分 (主として赤血球) による目詰りが生じがたく、かつ血球と血漿の分離に要する時間が短いので、定量分析精度が高くなるという特徴がある。

【0041】弗素含有ポリマーの微多孔性膜は特開昭57-66359 (US 4783315) に記載の物理的活性化処理 (好ましくはグロー放電処理又はコロナ放電処理) を微多孔膜層の少なくとも片面に施すことにより微多孔性膜の表面を親水化して、隣接する微多孔性膜と

の部分接着に用いられる接着剤の接着力を強化することができる。

【0042】弗素含有ポリマーの微多孔性膜は、そのままでは、表面張力が低く乾式分析要素の血球濾過層として用いようとしても、水性液体試料ははじかれてしまって、膜の表面や内部に拡散、浸透しないことは、周知の事実である。本発明では、第1の手段として弗素含有ポリマーの微多孔性膜に親水性を付与し親水性を高める手段として、弗素含有ポリマーの微多孔性膜の外部表面及び内部の空隙の表面を実質的に親水化するに充分な量の界面活性剤を弗素含有ポリマーの微多孔性膜に含浸させることにより、前記の水性液体試料がはじかれる問題点を解決した。

【0043】水性液体試料がはじかれることなく膜の表面や内部に拡散、浸透、移送されるに充分な親水性を弗素含有ポリマーの微多孔性膜に付与するには、一般に、弗素含有ポリマーの微多孔性膜の空隙体積の約0.01%から約10%、好ましくは約0.1%から約5.0%、更に好ましくは0.1%から1%の界面活性剤で微多孔性膜の空隙の表面が被覆されることが必要である。例えば、厚さが $5.0\mu\text{m}$ の弗素含有ポリマーの微多孔性膜の場合に、含浸される界面活性剤の量は、一般に $0.05\text{g}/\text{m}^2$ から $2.5\text{g}/\text{m}^2$ の範囲であることが好ましい。弗素含有ポリマーの微多孔性膜に界面活性剤を含浸させる方法としては、界面活性剤の低沸点 (沸点約 50°C から約 120°C の範囲が好ましい) の有機溶媒 (例、アルコール、エステル、ケトン) 溶液に弗素含有ポリマーの微多孔性膜を浸漬し、溶液を微多孔性膜の内部空隙に実質的に充分に行きわたらせた後、微多孔性膜を溶液から静かに引き上げ、風 (温風が好ましい) を送り乾燥させる方法が一般的である。

【0044】弗素含有ポリマーの微多孔性膜を親水性化処理に用いられる界面活性剤としては、非イオン性 (ノニオン性)、陰イオン性 (アニオン性)、陽イオン性 (カチオン性)、両性いずれの界面活性剤をも用いることができる。

【0045】これらの界面活性剤のうちでは、ノニオン性界面活性剤が、赤血球を溶血させる作用が比較的低いので、全血を検体とするための多層分析要素においては有利である。ノニオン性界面活性剤としては、アルキルフェノキシポリエトキシエタノール、アルキルポリエーテルアルコール、ポリエチレングリコールモノエステル、ポリエチレングリコールジエステル、高級アルコールエチレンオキシド付加物 (縮合物)、多価アルコールエステルエチレンオキシド付加物 (縮合物)、高級脂肪酸アルカノールアミドなどがある。

【0046】ノニオン性界面活性剤の具体例として、次のものがある。アルキルフェノキシポリエトキシエタノールとしては、

イソオクチルフェノキシポリエトキシエタノール:

(Triton X-100: オキシエチレン単位平均9~10含有)

(Triton X-45: オキシエチレン単位平均5含有)

ノニルフェノキシポリエトキシエタノール;

(IGEPAL CO-630: オキシエチレン単位平均9含有)

(IGEPAL CO-710: オキシエチレン単位平均10~11含有)

(LENEX 698: オキシエチレン単位平均9含有)

アルキルポリエーテルアルコールとしては、
高級アルコールポリオキシエチレンエーテル:

(Triton X-67: CA Registry No. 59030-1.5-8)

【0047】弗素含有ポリマーの微多孔性膜は、その多孔性空間に水不溶化した1種又は2種以上の水溶性高分子を設けることによって親水化したものであってもよい。水溶性高分子の例として、酸素を含む炭化水素にはポリビニルアルコール、ポリエチレンオキサイド、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、窒素を含むものにはポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアミン、ポリエチレンイミン、負電荷を有するものとしてポリアクリル酸、ポリメタアクリル酸、ポリスチレンスルホン酸などをあげることが出来る。不溶化は熱処理、アセタール化処理、エステル化処理、重クロム酸カリによる化学反応、電離性放射線による架橋反応等によって行えばよい。詳細は、特公昭56-2094号公報及び特公昭56-16187号公報に開示されている。

【0048】ポリスルホンの微多孔性膜は、ポリスルホンをジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチル-2-ピロリドンあるいはこれらの混合溶媒等に溶解して製膜原液を作製し、これを支持体上に、又は直接凝固液中に流延し洗浄、乾燥して行うことにより製造することができる。詳細は特開昭62-27006号公報に開示されている。ポリスルホンの微多孔性膜は、そのほか特開昭56-12640号公報、特開昭56-86941号公報、特開昭56-154051号公報等のも開示されており、それらも使用することができる。ポリスルホンの微多孔性膜も弗素含有ポリマーと同様界面活性剤を含有させ、あるいは水不溶化した水溶性高分子を設けることによって親水化することができる。

【0049】繊維質多孔性膜と非繊維質多孔性膜の積層体における非繊維質多孔性膜としては、特公昭53-21677号、米国特許1,421,341号等に記載されたセルロースエステル類、例えば、セルロースアセテート、セルロースアセテート/ブチレート、硝酸セルロースからなるブラッシュポリマー膜が好ましい。6-ナイ

ロン、6, 6-ナイロン等のポリアミド、ポリエチレン、ポリプロピレン等の微多孔性膜でもよい。その他、特公昭53-21677号、特開昭55-90859号等に記載された、ポリマー小粒子、ガラス粒子、けい藻土等が親水性または非吸水性ポリマーで結合された連続空隙をもつ多孔性膜も利用できる。

【0050】非繊維層多孔性膜の有効孔径は0.3~10 μ m、好ましくは0.5~5 μ m、特に有効なのは1~3 μ mである。本発明で非繊維層多孔性膜の有効孔径は、ASTM F316-70に準拠した限界泡圧法

(バブルポイント法)により測定した孔径で示す。非繊維層多孔性膜が相分離法により作られたいわゆるブラッシュ・ポリマーから成るメンブランフィルターである場合、厚さ方向の液体通過経路は、膜の製造の際の自由表面側(即ち光沢面)で最も狭くなっているのが普通で、液体通過経路の断面を円に近似したときの孔径は、自由表面の近くで最も小さくなっている。容積の通過経路における厚さ方向に関する最小孔径は、さらにフィルターの面方向について分布を持っており、その最大値が粒子に対する濾過性能を決定する。通常、それは限界泡圧法で測定される。

【0051】上に述べたように、相分離法により作られたいわゆるブラッシュ・ポリマーから成るメンブランフィルターでは、厚さ方向の液体通過経路は膜の製造の際の自由表面側(即ち光沢面)で最も狭くなっている。本発明の分析要素の非繊維層多孔性膜としてこの種の膜を用いる場合には、出口側を、メンブランフィルターの光沢面とすることが好ましい。

【0052】繊維質多孔性層を構成する材料としては、濾紙、不織布、織物生地(例えば平織生地)、編物生地(例えば、トリコット編)、ガラス繊維濾紙等を用いることができる。これらのうち織物、編物等が好ましい。織物等は特開昭57-66359号に記載されたようなグロー放電処理をしてもよい。

【0053】繊維質多孔性膜の空隙体積(単位面積当たり、以下同じ)は非繊維質多孔性層と同じでもよいし、異なってもよい。両者の空隙体積の関係を調整するには、両者の空隙率又は厚さを変えてもよいし、厚さと空隙率の両方を変えてもよい。

【0054】本発明で用いられる濾過材料が積層体である場合には特開昭62-138756~8号公報、特開平2-105043号公報、特開平3-16651号公報等に開示された方法に従って各層を部分的に配置された接着剤で接着して一体化することができる。

【0055】本発明の濾過材料では、その表面のみで血球をトラップする訳ではなく、ガラス繊維濾紙の厚さ方向に浸透するに従って、初めは大きな血球成分、後には小さな血球成分と徐々に空隙構造にからめ、厚さ方向に全長にわたって血球を留め除去していく、いわゆる体積濾過作用によるものと理解される。

【0056】本発明になる方式においては、供給されるすなわち分離しようとする血液の量に応じて、濾過材料の密度、厚さおよび面積等を選択することができる。ガラス繊維濾紙を用いる場合には、分離回収される血漿または血清の量がガラス繊維濾紙の体積の10%以上、好ましくは20~100%程度、特に好ましくは30~70%程度となるようにする。具体的には、目標とする血漿量の2倍程度の体積のガラス繊維濾紙を用いる。

【0057】濾過しようとする全血の供給量には特に制限はない。全血の量がガラス繊維濾紙の体積よりも小さくても血漿分離はうまくいくが、分離回収される血漿の全血に対する比（回収率）が低くなる。全血の量がガラス繊維濾紙の体積より大きい場合は、ガラス繊維濾紙の空隙を血球がほぼ充填し尽くしてしまうと、次いで、血球がガラス繊維濾紙から漏れだしてくる。この場合に、微多孔性膜が設置されていると、この膜により血球が止められるので、ガラス繊維濾紙のみを使用する場合より分離回収される血漿の量が増加する。なお、通常最適な全血の量はガラス繊維濾紙の体積を1とすると0.5~1.0、好ましくは0.7~5、さらに好ましくは0.8~3である。

【0058】濾過をする際には、血液供給側からの加圧あるいは反対側からの吸引を行って、濾過を促進することが好ましい。その際加圧あるいは減圧する体積を濾過材料の体積の2~5倍とすることが好ましい。また、上記加圧、吸引をする時間に厳密な制限は無いが、溶血を防ぐためには60秒以内として速やかに濾過を行うことが好ましい。例えば、1mlの全血を濾過する場合には1~60秒、好ましくは2~30秒、更に好ましくは5~20秒の範囲で加圧もしくは吸引の後、速やかに大気圧に戻すことが好ましい。

【0059】このように、本発明になる方式では、分離回収する必要のある血漿量を予め設定しておき、これに対応するガラス繊維濾紙の体積を設定し、十分な量の血液を供給した後に加圧もしくは吸引し、必要量の血漿が得られた時点、あるいは予め設定した時間を超えた時点で大気圧に戻すことにより、分析に必要な量の血漿試料が得られる。濾過で得た血漿や血清は常法に従って分析が行われるが、本発明の方法は特に乾式分析素子を用いて複数項目を分析する場合に有効である。

【0060】

【実施例】

実施例1

① 濾過ユニットの製作

図1に示す濾過ユニットを使用した。この濾過ユニット1はフィルターホルダー2とシリンジ3からなっている。フィルターホルダー2は外径25mm内径20mmの短円筒状をしており、フィルターを収納するフィルターホルダー本体4と該本体4に螺着する蓋体5で構成されている。フィルターホルダー本体4は、下端が開放さ

12

れていて内側にはフィルター収容部6が形成され、外周面下部には蓋体5を螺着させる螺子溝が刻まれている。一方、上面は閉止されていてその中央には検体吸入口7が突出形成されている。蓋体5の内周面上部には本体4の螺子溝と螺合する螺子溝が刻まれている。蓋体5の底面は中央部が下方に膨出していてその下端にはシリンジ3のノズル8を嵌込む吸引口9が突出形成されている。

【0061】上記のフィルターホルダーを倒置してそこに直径20.1mmの円板に打ち抜いたガラス繊維濾紙

10 (ワットマン GF/D) を2枚重ねてセットした。この濾紙は、坪量122: 4g/m²、厚さ1.3mm、密度0.94g/cm³であった。その上に厚さ1mmのセルロース濾紙11 (Cytosep社 Cytosep、直径20.1mm) を直径13mmの穴を有する直径20.1mmの両面テープ12で固定した。その上に孔径2μm、厚さ0.15mmのポリスルホン多孔質膜13 (富士写真フイルム製PS、直径20.1mm) を重ね、更にその上に中心に直径8mmの穴を有する直径20.1mmの粘着ビニールテープ14を圧着した。

【0062】② 採血

男子健康者よりヘパリン添加全血5mlを採血した。ヘマトクリットを測定したところ44%であった。

【0063】③ ヘマトクリット低下試薬 (HL試薬) 溶液の調製

硫酸リチウム1水塩 (Li₂SO₄・H₂O) を秤量、蒸留水に溶解して、濃度が2Mの水溶液を調製した。

【0064】④ HL試薬添加全血の調製
容量2mlのサンプルチューブに③で調製したHL試薬溶液30μlを秤取り、これにヘパリン全血1.5mlを添加、混合した。ヘマトクリットを測ったところ30%であった。

【0065】⑤ 血漿濾過

④で調製した全血を①で製作した濾過ユニットに接続し、およそ60.0μl/minの吸引速度で20秒間吸引した。ポリスルホン膜上に血漿が濾過分離された。

【0066】⑥ 分離血漿の回収

濾過分離された血漿をマイクロピペットで吸引、秤取した。およそ3.95μlの血漿を分離回収できた。溶血は全く認められなかった。LDH活性を測定したところ、HL剤なしで遠心分離したコントロールで17.3u/L、HL剤添加後本法により濾過回収した血漿で17.9であり、コントロールと殆ど同じレベルであった。

【0067】用いたガラス繊維濾紙の体積は628mm³なのでその1/2は314mm³ (=314μl) である。本発明方法によれば、容易に且つ、確実にガラス繊維濾紙の体積の1/2以上の血漿を分離回収できることが確かめられた。

【0068】比較例1

① Li₂SO₄含浸ガラス濾紙の調製

13

Li_2SO_4 の1M水溶液10mlを調製し、直径50mmのシャーレに入れた。ワットマン社製ガラス繊維濾紙GF/Dを直径20mmの円板に打ち抜いた。ガラス繊維濾紙を水溶液に浸漬して、およそ1ml/cm²の Li_2SO_4 水溶液で湿潤させた後、室温にて放置、ついで60℃で3時間加熱して乾燥させた。

【0069】② 濾過ユニットへの組み込み
実施例1と同様にして、内径20mmの濾過ホルダー中に Li_2SO_4 を含浸、乾燥したGF/D2枚を設置し、更に実施例1と同様にして、濾過ユニットを完成させた。

【0070】③ 全血の調製
健康者から真空採血管にて5mlの全血を採取し、ヘパリン添加全血とした。その1.5mlをサンプルチューブに入れた。

【0071】④ 全血の吸引濾過
実施例1と同様にして、②で作製した濾過ユニットにより全血を吸引、濾過した。およそ23.0μlの血漿を濾過回収できたが、溶血のため真赤になっていた。血漿中*

*のHbの濃度は150~200mg/dlに相当するレベルであった。

【0072】また分離血漿のLDH活性を測定したところ、350IU/Lであった。一方 Li_2SO_4 を加えない全血について、LDHを測定したところ192IU/Lであった。

【0073】比較例2

実施例1の2ML Li_2SO_4 水溶液に代えて生理食塩水を全血に加えて、ヘマトクリット(Hct)の低下効果を調べた。ヘパリン添加全血1.5mlに生理食塩水を加えて混和後ヘマトグリッドを測定した。健康者の全血(Hct44%)と高ヘマトクリット全血(54%)の2レベルについて調べた。結果は表-1の通りであった。生理食塩水を用いた場合は赤血球の収縮などの作用は起こらないので、Hctの低下の程度は単純希釈を想定して算出した値とほぼ一致した。これらの濃度ではHctの低下効果は見られないことが確かめられた。

【0074】

【表1】

原液のHct (%)	生理食塩水の添加量 (μl)	希釈後のHct (%)	
		実測値	計算値
41	7.5	39	39
	150	38	37
	300	34	34
	1500	21	21
57	7.5	55	54
	150	52	52
	300	48	48
	1500	28	29

【0075】実施例2

健康女子より採血し、ヘパリン添加全血20mlを得た。このもののHctを測ったところ41%であった。その1部を遠心分離して血漿を抜き取り高いHct値の全血を調製した。また全血に血漿のみを添加して低いHctの全血を調製した。全部でHctの異なる検体5種類(No.1~No.5)を調製した。No.1~No.5の検体について、2Mの Li_2SO_4 を全血1mlあたり※

※50μl添加した。実施例1と同じ濾過ユニットを用いて減圧濾過した。但し、全血を上部から導入し、下部吸引口に5mlの注射筒をセットし、800μlの排気量で30秒間かけて吸引した。ガラス繊維濾紙の体積は185mm³(=185μl)であった。

【0076】

【表2】

i ₂ SO ₄ を全血1mlあたり※						
Hct (%)		20	41	48	59	68
回収 血漿量	実施例	540	410	325	215	180
	比較例	200	130	80	35	10

【0077】比較例3

同じ濾過ユニットを用い、同じ条件で全血に Li_2SO_4 を添加しないで血漿濾過を試みた。回収血漿量はヘマトクリットが高い程、ヘマトクリット低下剤の効果が顕著であった。48%以下では1/4~1/2.7程度であったが、59%では1/7、68%では殆ど血漿は回収できなかった。また溶血の程度も無添加の場合48%以下で微溶血あるいは高強度の溶血が観測された。

【0078】実施例3

実施例1と同様の実験において、2Mの Li_2SO_4 水溶液15μlを全血1.5mlに添加した後、実施例1と同じ方法により血漿濾過を行ったところ、溶血のない血漿を228μl回収できた。用いた全血のHctはHL剤の添加前が48%、添加後が42%であった。

【0079】このようにして分離回収した血漿を検体として富士ドライケム5500及び富士ドライケム800（富士写真フィルム(株)製）を用いて血漿成分を測定した。この測定値から、HL剤を添加しない全血に同濃度の Li_2SO_4 を加えてから遠心分離して得た血漿を用いて作成した検量線を用いて、表3の結果を得た。コント

ロールとして、HL剤を添加しなかった全血を遠心分離して得た血漿を検体として用いて測定した。測定した23項目全てについて、コントロールと同じレベルの正確度で測定されていることが確かめられた。

【0080】

【表3】

連番	項目名	単 位	CONTROL 測定値	SAMPLE 測定値	%
1	GLU	mg/dl	107	106	99
2	BUN	mg/dl	16.6	17	102
3	CRE	mg/dl	0.9	0.9	100
4	UA	mg/dl	6.2	6.2	100
5	TCHO	mg/dl	171	174	102
6	TG	mg/dl	65	64	99
7	TBIL	mg/dl	0.8	0.9	113
8	Ca	mg/dl	9.4	9.7	103
9	IP	mg/dl	-2.3	2.2	96
10	TP	g/dl	7.9	7.7	98
11	ALB	g/dl	4.8	4.8	100
12	GGT	U/l	20	19	95
13	GOT	U/l	14	16	114
14	GPT	U/l	12	13	108
15	CPK	U/l	125	127	102
16	LDH	U/l	152	160	105
17	ALP	U/l	225	224	100
18	AMYL	U/l	67	67	100
19	LAP	U/l	58	61	105
20	NH ₃	mg/dl	39	41	105
21	Na	mep/l	138	137	99
22	K	mep/l	3.6	3.6	100
23	Cl	mep/l	99	98	99

【0081】なお、HL剤添加前の全血を濾過したところ、溶血のない血漿を分離回収することはできなかった。

【0082】実施例4

全血を血球と血漿に分けてから両者を混合し、Hctが20%、40%、48%、60%になるように調整した全血検体を調整した。これを用い、実施例3と同じように処理し、日立7150および富士ドライケム800電解質測定機を用いて測定した。結果を図2に示す。

【0083】測定した全項目について、Hctが20～60%の範囲で測定結果のズレの程度は、コントロールに対して±10%の範囲に入っていた。また、Hct48%の値を基準とした時のズレの程度も一部の項目を除いて±5%に入っていた。

【0084】

【発明の効果】本発明により、全血からの血漿分離の効率を上げ、回収血漿量を増やすことができる。また、添加する試薬を適切に選択することにより、低いヘマトクリット値の全血から高いヘマトクリット値の全血まで、簡単な濾過操作により遠心分離血漿と同じレベルの精度、正確度での測定が可能で、成分的に偏りのない血漿

が得られる。

【図面の簡単な説明】

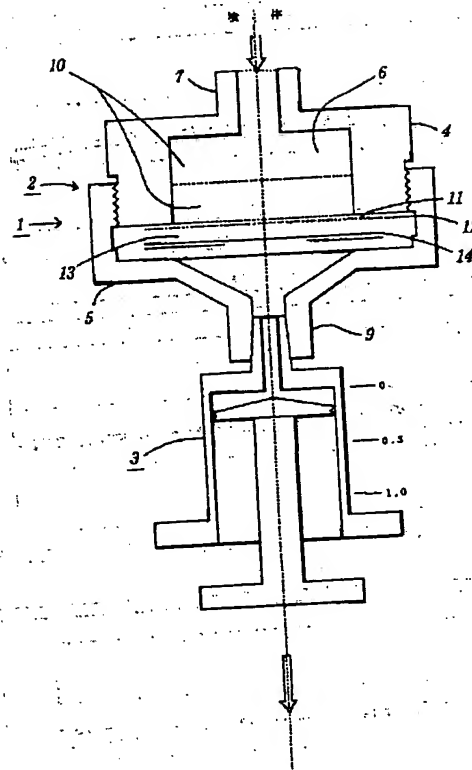
【図1】本発明の実施例で使用した濾過ユニットの断面図である。

【図2】Hct値の異なる検体を用いて濾過し、分離した血漿を用いて測定したときの精度と正確度を示す。

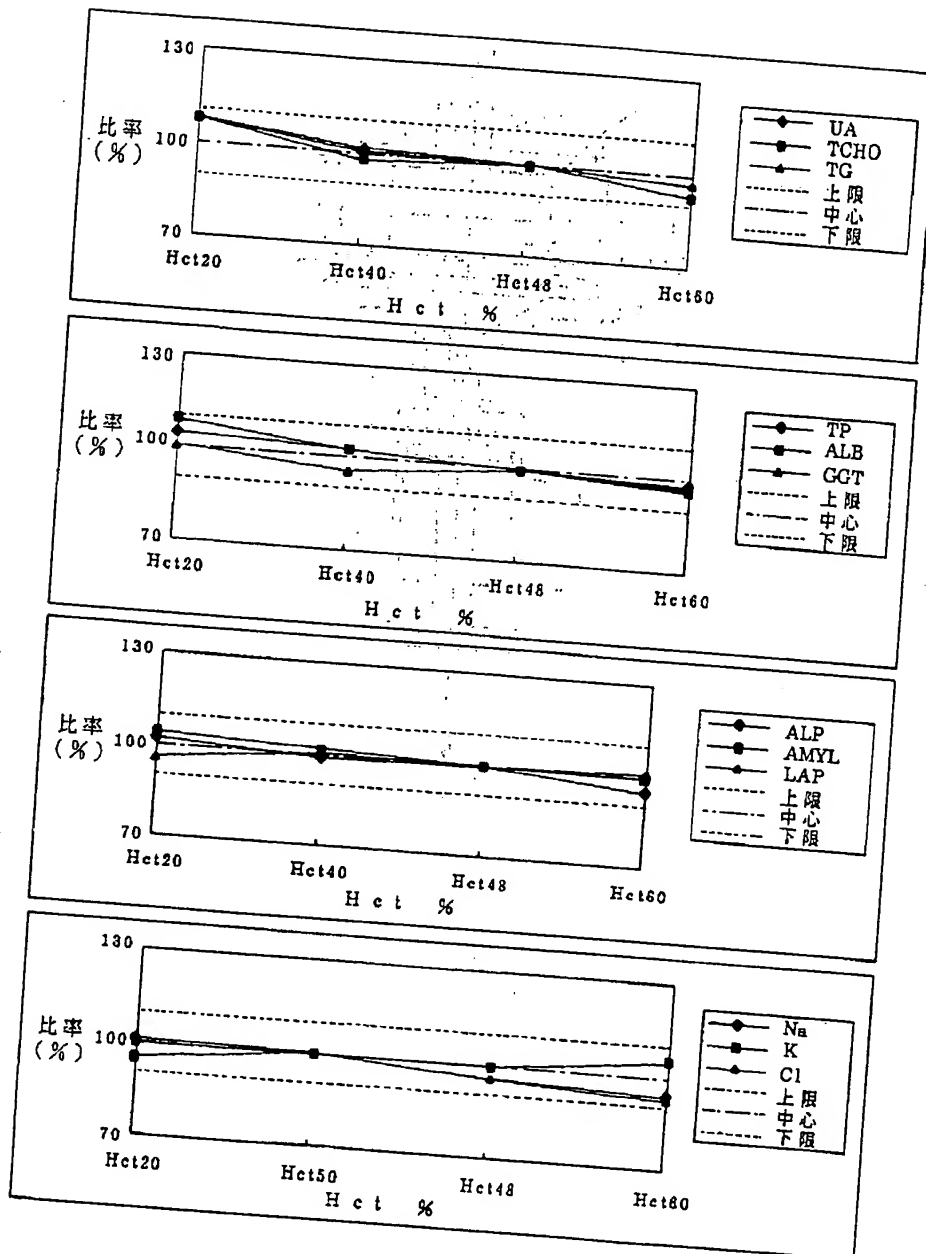
【符号の説明】

- 1…濾過ユニット
- 2…フィルターホルダー
- 3…シリンジ
- 4…ホルダー本体
- 5…蓋体
- 6…フィルター収容部
- 7, 9…血液出入口
- 8…ノズル
- 10…ガラス繊維濾紙
- 11…セルロール濾紙
- 12…両面テープ
- 13…ポリスルホン微多孔性膜
- 14…流出面積規制部材

【図1】



【図2】



【手続補正書】

【提出日】平成8年4月1日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項2

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項2】 請求項1において、該無機塩またはアミノ酸もしくはその塩の水溶液の濃度が0.1~5mol/Lであることを特徴とする、全血から血漿または血清

試料を調製する方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正内容】

【0016】無機塩、アミノ酸およびその塩であるHLL剤はいずれも水溶性であって溶解度が20℃で100mg/mol以上、好ましくは1mol/L以上、さらに

好ましくは 3 mol/l 以上のものが適当である。無機塩の例としては1価または2価のアルカリ金属またはアルカリ土類金属とハロゲン元素、 NO_3 、 SO_4 または CO_3 との組合せからなるものを挙げることができる。代表例には、 NaCl 、 CsCl_2 、 Li_2SO_4 、 CaCl_2 、 Rb_2SO_4 、 Cs_2SO_4 などがある。アミノ酸の例としては天然アミノ酸を挙げるができる。代表例にはGly、Ala、Asp、Glu、グリシンアミドアスパラギンなどがある。無機塩やアミノ酸は水溶液のpHが5~8、好ましくは6~7、5になるようにし、そのため、無機塩やアミノ酸塩は NaHCO_3 のように水素塩であってもよい。また、アミノ酸もAspやGluのような酸性アミノ酸はアルカリ金属やアルカリ土類金属等の塩とし、LysやArgのような塩基性アミノ酸の場合にはハロゲン元素、 NO_3 、 SO_4 、 CO_3 等の塩とすることができる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正内容】

【0018】上記のHL剤は水溶液として使用される。HL剤の濃度は $0.1 \sim 5 \text{ mol/l}$ 程度、好ましくは $0.5 \sim 3 \text{ mol/l}$ 程度、さらに好ましくは $1 \sim 2.5 \text{ mol/l}$ 程度が適当である。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0063

【補正方法】変更

【補正内容】

【0063】③ ヘマトクリット低下試薬 (HL試薬) 溶液の調製
硫酸リチウム水塩 ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) を秤量、蒸留水に溶解して、濃度が 2 mol/l の水溶液を調製した。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0068

【補正方法】変更

【補正内容】

【0068】比較例1

① Li_2SO_4 含浸ガラス濾紙の調製

Li_2SO_4 の 1 mol/l 水溶液 10 ml を調製し、直径 50 mm のシャーレに入れた。ワットマン社製ガラス繊維濾紙GF/Dを直径 20 mm の円板に打ち抜いた。ガラス繊維濾紙を水溶液に浸漬して、およそ 1 ml/cm^2 の Li_2SO_4 水溶液で湿潤させた後、室温にて放置、ついで 60°C で3時間加熱して乾燥させた。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0073

【補正方法】変更

【補正内容】

【0073】比較例2

実施例1の 2 mol/l Li_2SO_4 水溶液に代えて生理食塩水を全血に加えて、ヘマトクリット (Hct) の低下効果を調べた。ヘパリン添加全血 1.5 ml に生理食塩水を加えて混和後ヘマトクリットを測定した。健常者の全血 (Hct 44%) と高ヘマトクリット全血 (54%) の2レベルについて調べた。結果は表-1の通りであった。生理食塩水を用いた場合は赤血球の収縮などの作用は起こらないので、Hctの低下の程度は単純希釈を想定して算出した値とほぼ一致した。これらの濃度ではHctの低下効果は見られないことが確かめられた。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0075

【補正方法】変更

【補正内容】

【0075】実施例2

健常女子より採血し、ヘパリン添加全血 20 ml を得た。このもののHctを測ったところ41%であった。その1部を遠心分離して血漿を抜き取り高いHct値の全血を調製した。また全血に血漿のみを添加して低いHctの全血を調製した。全部でHctの異なる検体5種類 (No. 1~No. 5) を調製した。No. 1~No. 5の検体について、 2 mol/l の Li_2SO_4 を全血 1 ml あたり $50 \mu\text{l}$ 添加した。実施例1と同じ濾過ユニットを用いて減圧濾過した。但し、全血を上部から導入し、下部吸引口に 5 ml の注射筒をセットし、 $800 \mu\text{l}$ の排気量で30秒間かけて吸引した。ガラス繊維濾紙の体積は $185 \text{ mm}^3 (=185 \mu\text{l})$ であった。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0078

【補正方法】変更

【補正内容】

【0078】実施例3

実施例1と同様の実験において、 2 mol/l の Li_2SO_4 水溶液 $15 \mu\text{l}$ を全血 1.5 ml に添加した後、実施例1と同じ方法により血漿濾過を行ったところ、溶血のない血漿を $228 \mu\text{l}$ 回収できた。用いた全血のHctはHL剤の添加前が48%、添加後が42%であった。